



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/11, 15/85, A61K 31/70 // A61K 48/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/10302 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 1994 (11.05.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP93/02968 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 1993 (27.10.93) (30) Prioritätsdaten: P 42 36 582.1 29. Oktober 1992 (29.10.92) DE P 43 24 671.0 22. Juli 1993 (22.07.93) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : LIPPS, Hans-Joachim [DE/DE]; Hartmeyerstrasse 58, D-72076 Tübingen (DE). GRUMMT, Friedrich [DE/DE]; Walther-v.d. Vogelweide 55, D-97074 Würzburg (DE). MEYER, Jobst [DE/DE]; Aischbachstrasse 2, D-72070 Tübingen (DE).		(74) Anwälte: SCHREINER, Siegfried usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68298 Mannheim (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: AMPLIFIABLE VECTOR AGAINST HIV REPLICATION (54) Bezeichnung: AMPLIFIZIERBARER VEKTOR GEGEN HIV REPLIKATION (57) Abstract <p>A process is disclosed for inhibiting replication of HIV by transfecting potential host cells with a vector which contains, besides the Pol, Gag, Env, Rev and/or Tat-coding DNA in the anti-sense direction, an additional DNA which causes spontaneous amplification of the vector in the host cell. Also disclosed is the vector used to carry out this process.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Replikation von HIV durch Transfektion potentieller Wirtszellen mit einem Vektor, der neben einer für Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat codierenden DNA in antisense-Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt, sowie den bei diesem Verfahren verwendeten Vektor.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolien	VN	Vietnam

Amplifizierbarer Vektor gegen HIV Replikation

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Replikation von HIV durch Transfektion potentieller Wirtszellen mit einem Vektor, der neben einer für Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat codierenden DNA in antisense-Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt, sowie den bei diesem Verfahren verwendeten Vektor.

Zur Verhinderung einer Infektion mit Human Immunodeficiency Virus (HIV) sind bereits verschiedene Ansätze untersucht worden. Hierzu gehört die Hemmung der Bindung des Virus an T-Lymphozyten durch Antikörper gegen virale Proteine oder Zugabe großer Mengen an isoliertem CD4 Rezeptorprotein aus T-Lymphozyten, den Zielzellen von HIV. Eine andere Möglichkeit ist die Hemmung der zur Vermehrung von HIV in den Zielzellen erforderlichen viralen reversen Transkriptase mit 3'-Azido-Thymidin (AZT) oder ähnlichen Substanzen. Diese Ansätze haben jedoch bislang noch zu keiner erfolgreichen Therapie von HIV-Infektionen geführt. Einerseits weisen die viralen Proteine durch Mutation und Selektion eine hohe Variabilität auf, so daß die verwendeten Antikörper oft nicht mehr an die veränderten viralen Proteine binden. Andererseits sind die verwendeten Replikations-Inhibitoren auch für die Zielzellen toxisch. Es konnte zwar gezeigt werden, daß die HIV-Replikation durch Transfektion von T-Lymphozyten mit antisense-Oligonukleotiden, die zu verschiedenen Bereichen des HIV Genoms komplementär sind

und so deren Expression inhibieren, gehemmt werden kann (Zala et al., J. Virol. 62 (1988), 3914 - 3917 und Joshi et al., J. Virol. 65 (1991), 5524 - 5530). Da jedoch Oligonukleotide in der Zelle schnell abgebaut werden, konnte auf diese Weise nur eine kurzfristige Hemmung der HIV-Replikation erzielt werden. Es wurden daher Vektoren konstruiert, von denen nach stabiler Transfektion von T-Lymphozyten antisense-RNA transkribiert wird (N. Sarver et al. Science 247 (1990), 1222 - 1225). Jedoch konnte auch mit diesen Vektoren nur eine über einige wenige Tage andauernde Hemmung der HIV-Replikation erreicht werden. Das Ausmaß der Hemmung der HIV-Replikation korreliert dabei mit der Menge der transkribierten antisense-RNA (Zala et al., J. Virol. 62 (1988), 3914 - 3917 und Rittner et al., Nucl. Acids Res. 19 (1991), 1421 - 1426). Diese Menge wird dadurch limitiert, daß bei den bisher bekannten Vektoren nur solche stabil transformierten T-Lymphozyten erhalten werden können, die nur eine einzige oder sehr wenige Kopien des antisense-RNA transkribierenden Vektors enthalten.

Zur Erhöhung der Expression heterologer Proteine wurde versucht, Vektoren zu konstruieren, die stabil in mehreren Kopien je Wirtszelle gehalten werden können. Hierzu werden Wirtszellen mit einem Vektor, der ein Resistenzgen als Selektionsmarker enthält, transfiziert und in einem Medium mit einer solchen Konzentration einer geeigneten Substanz kultiviert, daß nur solche transfizierte Wirtszellen überleben, bei denen der Vektor in mehreren Kopien amplifiziert vorliegt. Die hierbei verwendeten eukaryontischen Vektoren enthalten jedoch für die autonome Replikation in der Wirtszelle Origin Sequenzen, die von Viren abgeleitet wurden. Da die Gegenwart von viralen Nukleinsäure-Sequenzen bei der

- 3 -

Herstellung von therapeutisch anzuwendenden Produkten vermieden werden sollte, sind auch Vektoren entwickelt worden, welche Origin Sequenzen aus Säugerzellen enthalten (EP-A 0 306 848 und M. Wegner et al., Nucl. Acids Res. 17 (1989), 9909 - 9932). Zur Amplifikation enthalten derartige Vektoren ein ineffizientes Selektionssystem. Unter einem solchen ineffizienten Selektionssystem versteht man einen Selektionsmarker, der unter der Kontrolle eines schwachen Promoters steht, so daß die Expression von einer Kopie des Selektionsmarkers nicht ausreicht, um der Wirtszelle ein Überleben unter dem entsprechenden Selektionsdruck zu ermöglichen.

Bei allen diesen beschriebenen Systemen werden die transfizierten Zellen ständig in Gegenwart eines Selektionsmittels gehalten, um die erhöhte Kopienzahl des Vektors aufrecht zu erhalten. Da als Selektionsmittel Zytostatika verwendet werden, welche das Wachstum von eukaryontischen Zellen generell hemmen, sind derartige amplifizierbare Expressionsvektoren für eine therapeutische Verwendung jedoch ungeeignet.

Aufgabe der Erfindung war es daher, ein Verfahren zur Hemmung der HIV-Replikation zur Verfügung zu stellen, welches die oben genannten Nachteile nicht aufweist.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Hemmung der Replikation von HIV, bei welchem potentielle Wirtszellen mit einem Vektor transfiziert werden, der neben einer für Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat codierenden DNA in antisense-Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.

Geeignete DNA-Sequenzen, welche eine solche spontane Amplifikation bewirken, sind erhältlich über ein Screening mit dem in EP-A 306 848 beschriebenen ineffizienten Selektionssystem. Hierzu werden etwa 40 -500 bp lange nicht codierende eukaryontische DNA-Sequenzen, vorzugsweise aus dem nicht transkribierten Bereich der rDNA eukaryontischer Zellen in einen Vektor insertiert, der einen Selektionsmarker unter der Kontrolle eines schwachen Promoters enthält. Die Expression von einer Kopie des Selektionsmarkers reicht daher nicht aus, um einer mit diesem Vektor transfizierten Wirtszelle ein Überleben unter dem entsprechenden Selektionsdruck zu ermöglichen. Auf diese Weise werden solche Zellen selektioniert, die den zur Transfektion verwendeten Vektor in hoher Kopienzahl enthalten. Aus diesen amplifizierten Vektoren kann dann die insertierte DNA als eine DNA, die eine Amplifikation unter Selektionsdruck bewirkt, gewonnen werden. In einem zweiten Selektionsschritt wird dann eine DNA, welche eine spontane Amplifikation bewirkt, selektioniert. Dazu werden die im ersten Selektionsschritt erhaltenen DNA-Sequenzen in einen eukaryontischen Vektor insertiert, mit dem erhaltenen Vektor eukaryontische Wirtszellen transfiziert und nach üblichen Verfahren, z.B. über eine Southern-Blot Analyse, die Kopienzahl des Vektors in den transfizierten Zellen bestimmt. Diejenigen Klone, die einen Vektor mit einer um mindestens den Faktor 20 erhöhten Kopienzahl aufweisen (bezogen auf die Kopienzahl des Ausgangsvektors), werden ausgewählt.

Geeignete Selektionsmarker für den ersten Selektionsschritt sind z.B. das Thymidinkinase-Gen tk (Nature 303 (1983), 442 - 446), das Neomycinresistenz-Gen neo (J. Mol. Appl. Genet.

- 5 -

1 (1982), 327 - 341), das Dihydrofolatreduktase-Gen dhfr (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 4216 - 4220 und J. Mol. Biol. 15 (1982), 601 - 621), das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen hgp^{rt} (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072 - 2076), das Adenin-Phosphoribosyltransferase-Gen ap^{rt} oder das Metallothionein Gen. Die entsprechenden Selektionsmittel sind dem Fachmann geläufig, insbesondere werden Aminopterin (bei tk, hgp^{rt}, ap^{rt} und dhfr), Methotrexat (bei dhfr) und G418 (bei neo) verwendet. Bei Verwendung der genannten nicht dominanten Selektionsmarker (tk, dhfr, hgp^{rt} und ap^{rt}) müssen die zu transfizierenden Wirtszellen in dem entsprechenden Gen eine Defizienz aufweisen. Dazu sind z.B. bei Verwendung des tk-Gens als Selektionsmarker murine LMTK⁻-Zellen (ATCC CCL 1.3) geeignet.

Als schwacher Promoter wird vorzugsweise ein Promoter verwendet, dessen Wirksamkeit durch Einführung von Punktmutationen (Cell 37 (1984), 743 - 751) oder Deletionsmutagenese (Cell 37 (1984), 253 - 262) reduziert wurde. Beispielsweise kann im tk-Promoter eine solche Deletion der distalen SP-1 Bindungsstelle durch Entfernen eines EcoRI Fragments bewirkt werden (Nucl. Acids Res. 8 (1980), 5949 - 5964). Die Promoterstärke kann aber auch durch Zugabe von entsprechenden Repressoren reduziert werden (EMBO J. 2 (1983), 2229 - 2303; Cell 48 (1987), 555 - 566 und Cell 49 (1987), 603 - 612).

Gemäß dem oben beschriebenen Verfahren konnten die in SEQ ID NO 1 und 2 angegebenen Sequenzen gewonnen werden. Weiterhin sind auch die in EP-A 0 306 848 beschriebenen Sequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet.

Die für Pol (Reverse Transkriptase), Gag (Core), Env (Hüllprotein) Rev und/oder Tat codierende DNA kann entweder eine vollständige cDNA des entsprechenden viralen Gens sein oder ein Fragment dieser DNA darstellen. Die Länge dieser DNA sollte jedoch nicht kürzer sein als 60 Basenpaare. Beispielsweise wird eine DNA verwendet, welche für die Reverse Transkriptase codiert oder ein Fragment dieser DNA.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bei Verwendung eines derartigen Vektors bei 20-30 % der Transfektanten eine 30- bis über 100-fache Amplifikation des Vektors auch in Abwesenheit eines entsprechenden Selektionsdrucks erreicht werden kann. Dies ist für eine therapeutische Verwendung von großer Bedeutung, da üblicherweise zur Selektion Substanzen verwendet werden, die auch das Wachstum gesunder Wirtszellen hemmen. Es hat sich weiterhin überraschenderweise gezeigt, daß diese spontane Amplifikation des Vektors stabil ist, d.h. auch nach mehreren Monaten Kultivierung der transfizierten Zellen ohne Selektionsdruck bleibt die hohe Kopienzahl erhalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Vektor zur Hemmung der Replikation von HIV in potentiellen Wirtszellen, welcher neben einer für Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat codierenden DNA in antisense-Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.

Vorzugsweise enthält ein erfindungsgemäßer Vektor mehrere DNA Bereiche aus der Gruppe der für Pol, Gag, Env, Rev oder Tat codierenden DNA in antisense-Orientierung.

Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind Vektoren, welche als Sequenz, die eine spontane Amplifikation des Vektors bewirkt, die in SEQ ID NO 1 oder 2 angegebenen Sequenzen aufweisen. Besonders bevorzugt ist der Vektor pNTS1-RTanti.

Durch die Transfektion von T-Lymphozyten mit einem solchen Vektor kann eine Hemmung der HIV-Replikation erreicht werden, die auch in Abwesenheit eines entsprechenden Selektionsdrucks für mehrere Monate anhält. Daher eignet sich dieser Vektor besonders für eine therapeutische Verwendung zur Verhinderung der Replikation von HIV in T-Lymphozyten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur therapeutischen Behandlung von HIV-Infektionen.

Die für Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat codierende DNA kann durch eine für ein anderes Genprodukt codierende DNA in antisense-Orientierung im erfindungsgemäßen Vektor ausgetauscht werden. Dadurch werden amplifizierbare Vektoren erhalten, welche die Expression dieses Genprodukts hemmen. Solche Vektoren können zur Therapie von Krankheiten verwendet werden, die durch eine erhöhte Expression des entsprechenden Genproduktes verursacht werden. Vorzugsweise können z.B. solche Vektoren, die eine für das bcr-abl-Fusionsprotein (Collins et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80 (1983), 4813 - 4817 und C. Bartram, J.Exp.Med. 162 (1965), 2175 - 2179) oder Teile davon codierende DNA in antisense-Orientierung enthalten, zur Therapie von akuter myeloischer Leukämie verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche mindestens einen Vektor enthält, der neben einer für ein Genprodukt, dessen erhöhte Expression eine krankhafte Veränderung bewirkt, codierenden DNA in antisense-Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.

Eine solche pharmazeutische Zusammensetzung kann vorteilhaft bei allen therapeutischen Verfahren verwendet werden, bei denen eine Hemmung der Genexpression durch eine antisense-RNA bewirkt werden soll (siehe z.B. Izant et al., Cell 36 (1984), 1007 - 1015, Melton et al., Proc.Natl.Acad. Sci. USA 82 (1985), 144 - 148 und Giebelhaus et al., Cell 53 (1988), 601 - 605). Vorzugsweise enthält die pharmazeutische Zusammensetzung einen Vektor, der über eine solche antisense-Hemmung die Expression der zur Replikation von HIV essentiellen Genprodukte Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat bewirkt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor enthält, welcher neben einer für Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat codierenden DNA in antisense-Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.

Vorzugsweise werden Vektoren mit Antisensesequenzen gegen chronische myeloische Leukämie (CML) verwendet. CML wird verursacht durch reziproke Translokation der Chromosomen 9 und 22. Dadurch entsteht eine Fusions-RNA und ein Fusionsprotein. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der chromosomalen Translokation, der Produktion eines

Fusionsproteins und des Entstehens der Leukämie konnte nachgewiesen werden.

Als Antisensesequenzen geeignet sind Sequenzen, die gerichtet sind gegen die Fusionsregion der bcr/abl-Fusions-RNA. Die Antisensesequenzen sind üblicherweise 10 - 20 Basen lang. Bevorzugt wird eine 18 Basen lange Sequenz.

Es konnte gezeigt werden, daß solche Sequenzen, insbesondere eine 18er Sequenz eine Hemmung der CML bewirkt. Die Verwendung dieser Antisense DNS in einem Vektor, in dem die HIV-Sequenzen gegen diese Leukämie-Antisensesequenzen ausgetauscht sind, führen zu einer erheblichen Verbesserung der Antisensewirkung bei der Behandlung.

Literatur zu CML:

R.E. Champlin, Blood 65 (1988) 1039 - 1047 und G.Q. Doley, Science 247 (1990), 824 - 830.

Literatur zu CML-Antisense:

I.V. Rosti, Leucemia 6 (1992), 1 - 7 und R. Martiat, Blood 81 (1993), 502 - 509.

Die erfindungsgemäßen Vektoren können anstelle der Sequenzen zur Hemmung der HIV-Replikation codierende Gene, Fragmente davon und geeignete Promotoren/Operatorregionen, die zur Expression dieser Gene geeignet sind, enthalten. Solche Vektoren sind für die Gentherapie geeignet, bei der exogene Gene in Zellen eines Organismus/Patienten eingebracht werden und diese Zellen mit einer neuen (bzw. einer bisher

- 10 -

nur in reduziertem Umfang vorhandenen) Eigenschaft ausgestattet werden.

Unter Gentherapie sind therapeutische Verfahren zu verstehen, bei denen exogene Gene in Zellen eines Organismus/-Patienten eingebracht werden und diese Zellen mit einer neuen (bzw. einer bisher nur in reduziertem Umfang vorhandenen) Eigenschaft ausgestattet werden. Dabei werden Transkripte und Translationsprodukte des exogenen Gens aktiv in der Zielzelle gebildet.

Das Ziel eines solchen Verfahrens kann entweder ein "Genemarking" oder eine Gentherapie sein. Zum "Genemarking" wird ein selektives Markergen in Zielzellen eingeführt, um deren Überleben bzw. Wachstum diagnostisch zu verfolgen. Bei der eigentlichen Gentherapie wird mindestens ein Gen in die Zielzelle eingebracht, um ein Gen, welches in einem gesunden Organismus vorhanden ist, in defiziente Zellen einzubringen.

Die Gentherapie kann entweder als ex vivo-Therapie oder als in vivo-Therapie durchgeführt werden.

Ex vivo-Therapie

Bei der Ex vivo-Therapie werden einem Patienten Zellen entnommen, diese mit einem Vektor, der für die Expression eines gewünschten Gens geeignet ist, transduziert, die transduzierten Zellen ggf. selektioniert und anschließend dem Patienten reimplantiert. Als Vektoren geeignet sind virale Vektoren, die in den Zielzellen extrachromosomal bleiben oder in ein Chromosom integriert werden. Ebenso

- 11 -

denkbar ist es jedoch, in die Zielzellen nackte DNA, beispielsweise an Liganden gebunden, zellfrei, z. B. mit Hilfe von Liposomen oder Polylysinkomplexen in die Zellen einzubringen.

Werden als Basisvektoren beispielsweise Retroviren verwendet, scheint die Transduktionsrate limitierend zu sein.

Die Vektoren werden in Bakterien vermehrt und in Zellen (packaging-Zelllinien) transfiziert. Diese packaging-Zelllinien enthalten zusätzlich ein Helfervirus, welches die Verpackungsproteine zur Verfügung stellt. Dabei entsteht ein infektiöser, aber nicht replizierbarer Virus, der zur oben beschriebenen Transduktion geeignet ist.

Zur Sicherheit des Patienten ist es wesentlich, daß dieses Virusmaterial vollständig frei von Verunreinigungen mit Helferviren und packaging-Zelllinien ist.

Als Therapeutikum könnten dementsprechend vertrieben werden: Eine galenische Formulierung des Vektorvirus und ggf. die vektorproduzierende Line, wenn zur Erhöhung der Transduktion eine Co-Kultivierung von Patientenzellen mit dieser Zelle erforderlich ist.

In vivo-Therapie

Bei einer in vivo-Gentherapie wird der Patient direkt mit Virus-DNA oder mit nackter DNA zellfrei oder zellgebunden behandelt. Dabei erfolgt eine gewebsspezifische Expression des Fremdgens. Es ist möglich, die DNA intravenös, oral zu geben oder lokal zu applizieren.

- 12 -

Wird zellgebundene DNA zur in vivo-Therapie verwendet, so sollte entweder die Donorzelle nicht immunogen sein (Ausschaltung der MHC-Loci) oder es ist eine zusätzliche Immunsuppression erforderlich.

Die für die in vivo-Gentherapie geeigneten Virusvektoren entsprechen im wesentlichen Genen, die auch für die ex vivo-Therapie geeignet sind. Allerdings können sich optimal geeignete Vektoren für beide Verfahren unterscheiden. Als Viren, die für die in vivo-Therapie geeignet sind, sind stark modifizierte Viren, die spezifische Enhancer und Promotoren für eine optimierte gewebsspezifische Expression enthalten, besonders geeignet.

Für die in vivo-Therapie sind nicht replizierbare Retroviren geeignet, wenn eine Vorselektion der transduzierten Zellen erfolgt.

Bevorzugte Basisviren

Als Basis für Virussysteme geeignet sind Retroviren, Parvoviren, Herpesviren, Hepadnaviren, HBV- und HIV.

Herpesviren (HSV, VZV, CMV) sind lineare DNA-Viren mit einem Genom von ca. 80 - 230 kb Länge. Da DNA-Sequenz und Reihenfolge der Proteinbildung bekannt sind, ist eine ausreichende Basis vorhanden, um gut exprimierende Vektoren zu konstruieren.

- 13 -

Gentherapeutische Verfahren sind in den nachfolgenden Publikationen, die Gegenstand der Offenbarung dieser Erfindung sind, beschrieben:

EP-B 0 476 953, WO 92/05262, WO 85/05629, US 4980289, WO 89/11539, EP-A 0 371 119, WO 91/10728, WO 85/05629, US 4980289, WO 89/11539, WO 91/10728, WO 91/12329, WO 92/07943, US 4797368, US 5139941, EP 0488528, US Ser. No. 7769623, EP 0176170, WO 90/09441, WO 91/02788, EP 0453242, WO 92/07945, WO 90/02176, US 4650764, US 4861719, WO 89/07150, WO 90/02806, US 5124263, WO 92/05266, WO 92/10564, WO 92/14829, WO 92/16638, EP 0045809, WO 83/03259, US 4897355, WO 91/06309, WO 91/17424, WO 92/07080, EP-A 0202005, WO 92/08796, US 5112767, WO 90/06997, US Ser. No. 7365567, WO 92/07573, WO 92/12242, WO 92/15676, EP 0293193, WO 90/05180, WO 90/07936, WO 91/15580, WO 92/05262, EP 0476953, WO 92/05273.

Die Plasmide pCMV-RTanti (DSM 7304) und pNTS1-RTanti (DSM 7303) wurden am 23.10.1992 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D - 3300 Braunschweig, hinterlegt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele im Zusammenhang mit den Sequenzprotokollen näher erläutert.

SEQ ID NO 1 zeigt die murine Nukleotidsequenz muNTS1, welche eine spontane Amplifikation bewirkt

SEQ ID NO 2 zeigt die murine Nukleotidsequenz muNTS2, welche eine spontane Amplifikation bewirkt

Beispiel 1

Selektion von DNA-Sequenzen, welche eine spontane Amplifikation bewirken

In einem ersten Selektionsschritt werden DNA-Sequenzen, welche unter Selektionsdruck eine Amplifikation bewirken, ausgewählt. Dazu werden 40 - 500 bp lange nicht codierende eukaryontische DNA-Sequenzen vorzugsweise aus dem nicht transkribierten Bereich eukaryontischer rDNA in die BamHI-site des in EP-A 0 306 848 beschriebenen Vektors ptk (DSM 4203P) integriert. Dieser Vektor enthält das HSV1-tk-Gen unter der Kontrolle eines deletierten HSV1-tk-Promoters. Mit dem rekombinanten Vektor werden murine LMTK⁻-Zellen (ATCC CCL 1.3) gemäß dem von Graham in Virology 52 (1973), 456 - 467 und Wigler in Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979), 1373 - 1376 beschriebenen Verfahren transfiziert und solche Zellen, welche einen amplifizierten Vektor enthalten, durch Kultivierung für etwa 2 Wochen in HAT-Medium selektioniert.

Zellen, die keinen oder einen nicht amplifizierten Vektor enthalten, sterben hierbei ab und nur die gewünschten Zellen überleben.

Aus den aus diesen selektionierten Zellen gewonnenen Vektoren werden die integrierten DNA-Sequenzen isoliert, mit BamHI und SalI Linkern versehen und in den mit BglII und XhoI geschnittenen Vektor pCMV-RTanti (DSM 7304), der ein Neomycin Resistenzgen enthält, integriert. Mit diesem Vektor werden dann im zweiten Selektionsschritt Jurkat Zellen (ATCC TIB 152) transfiziert und transfizierte Zellen mit G418 selektioniert. Nach 2 Wochen wird die Kopienzahl

der Vektoren in resistenten Klonen über Southern-Blot Analyse bestimmt und solche Klone, welche einen Vektor mit einer Kopienzahl von mindestens 20 (bezogen auf die Kopienzahl des Ausgangsvektors) aufweisen, ausgewählt.

Beispiel 2

Konstruktion von amplifizierbaren antisense-Vektoren

Der immediate-early Promoter und Enhancer aus dem humanen Cytomegalie Virus (hCMV), fusioniert an die 57 bp lange Leader Sequenz aus dem Herpes simplex Thymidin Kinase-Gen Promoter und mit einem BamHI Linker versehen, wird als EcoRI/BamHI Fragment aus dem Plasmid pSTC GR 407-556 (Severne et al., EMBO J. 7 (1988), 2503 - 2508) in pUC 19 kloniert. Der so erhaltene Vektor pUC-CMV wird mit BamHI und XbaI geschnittenen und mit dem terminalen BamHI/XbaI Fragment aus dem klonierten *Stylomychia lemnae* β_1 -Tubulin-Gen (Conzelmann et al., J.Mol. Biol. 198 (1987), 643 - 653), welches das Polyadenylierungssignal aus dem Tubulin-Gen enthält, ligiert. Hierdurch wird der Vektor pUC-CMV-SlpA erhalten.

Eine für G418 Resistenz kodierende Expressionskassette, bestehend aus dem Maus Metallothionein Promoter, dem Aminoglycosid-3'-phosphotransferase-Gen (neo^R) des E.coli Transposons Tn5 und dem Polyadenylierungssignal von SV40 (aus dem Plasmid pML2d/BPV/MMT, Schmid et al., Nucl. Acids Res. 18 (1990), 2196) wird als EcoRI/Bam HI Fragment im Bluescript KS+ Vektor (Stratagene) kloniert. Die BamHI und BglII Schnittstellen des erhaltenen Konstrukts werden durch Klenow-Reaktion mit T4-Polymerase entfernt (Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning (1989), Cold Spring

Harbour Lab. Press). Die so veränderte Resistenz-Kassette wird als HindIII/XbaI Fragment isoliert und in pUC-CMV-SLpA kloniert, wodurch pCMV-SLpA erhalten wird.

Das 1236 bp große HindIII/EcoRV Fragment des Gens für die Reverse Transkriptase aus HIV-1 (Position 3024 - 4260) wird zwischen der HindIII und SmaI Schnittstelle von pBluescript KS+ kloniert. Aus diesem Subklon wird das Genfragment der Reversen Transkriptase als HindIII/XbaI Fragment erhalten und in den Vektor pSTC GR 407-556 (s. oben), der eine Glucocorticoid cDNA aus der Ratte enthält, ligiert. Ein 1397 bp großes BamHI Fragment aus diesem Vektor, das neben dem Fragment des Gens für die Reverse Transkriptase 117 bp der Glucocorticoid cDNA aus der Ratte enthält, wird entweder in sense oder in antisense Orientierung in die BamHI/BglII Schnittstelle von pCMV-SLpA ligiert, wodurch die Vektoren pUC-RT-Hi-EVsense und pUC-RT-Hi-EVanti erhalten werden.

Das 1826 bp große EcoRI Fragment von pSTC GR 407-556 wird dann gegen das 6036 bp große EcoRI Fragment aus entweder pUC-RT-Hi-EVsense oder pUC-RT-Hi-EVanti ersetzt, wodurch pCMV-RTsense bzw. pCMV-RTanti (DSM 7304) erhalten werden.

Ein 370 bp großes Fragment aus der nicht transkribierten Spacer Region der murinen rDNA (muNTS1, SEQ ID NO 1 und Wegner et al., Nucl. Acids Res. 17 (1989), 9909 - 9932) wird mit BamHI und SalI Linkern versehen und zwischen die BglII und XhoI Schnittstellen von pCMV-RTanti insertiert, wodurch pNTS1-RTanti (DSM 7303) erhalten wird.

Beispiel 3

Transfektion von menschlichen T-Lymphozyten mit amplifizierbaren antisense Vektoren und Hemmung der Aktivität der Reversen Transkriptase

Jurkat Zellen (ATCC TIB 152, T-lymphoblastoide Zelle) werden mit jeweils 10 µg der Plasmide pNTS1-RTanti bzw. pCMV-RTanti, pCMV-RTsense oder pCMV-SLpA als Kontrolle durch Elektroporation transfiziert (200V, 960 µF) und transfizierte Zellen mit 800 µg/ml G418 in RPMI 1640 Medium selektioniert. Nach zwei Wochen werden G418 resistente Klone isoliert und zunächst über Southern Blot Analyse charakterisiert.

Während die Plasmide pCMV-SLpA, pCMV-RTsense und pCMV-RTanti in den transfizierten Zellen nur in geringer Kopienzahl (weniger als 5 Kopien je Zelle) vorliegen, zeigen die mit pNTS1-RTanti transfizierten Zellen eine spontane Amplifikation auf 20 - 100 Kopien je Zelle. Die transfizierten Zellen, die einen amplifizierten Vektor enthalten, zeigen kein geringeres Wachstum als solche Zellen, die einen nicht amplifizierten Vektor enthalten. Die Amplifikation des pNTS1-RTanti Plasmids bleibt auch bei 3-monatiger Kultivierung in Abwesenheit von G418 stabil. Die über Northern Blot Analyse bestimmte Menge des antisense-Reverse-Transkriptase-Transkripts ist dabei etwa proportional zur Kopienzahl des Vektors.

Die mit den verschiedenen Vektoren transfizierten Jurkat Zellen werden mit 15 TCID₅₀ (tissue culture infective dose) von HIV-1 gemäß Popovic et al., Science 224 (1984), 497 - 500, infiziert und die Replikation des HIV-1 in den transfizierten Zellen über die Messung der Aktivität der Reversen Transkriptase im Kulturüberstand sowie über die Bildung von Syncytien bestimmt. Die Bestimmung der Aktivität der Reversen Transkriptase erfolgt über die Bestimmung des Einbaus von Radioaktivität bei einer cDNA-Synthese (Böhm et al., Cytometry 13 (1992), 259 - 266). Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle: Hemmung der HIV-1 Replikation in Jurkat Zellen durch den amplifizierbaren antisense Vektor pNTS1-RTanti

Vektor	RT-Aktivität nach 28 Tagen (cpm/ml)	Syncytienbildung
pCMV-SLpA	3.67 x 10 ⁵	+
pCMV-RTanti	4.52 x 10 ⁵	+
pNTS1-RTanti (30 Kopien je Zelle)	2.46 x 10 ⁵	±
pNTS1-RTanti (100 Kopien je Zelle)	0.24 x 10 ⁵	-

Beispiel 4:

Stabilität der amplifizierten Vektoren in Abwesenheit von G418

Gemäß Beispiel 3 mit pNTS1-RTanti transfizierte menschliche T-Lymphozyten werden 3 Monate in RPMI 1640 Medium ohne G418 kultiviert und anschließend die Kopienzahl von pNTS1-RTanti über Southern Blot Analyse bestimmt. Das Ergebnis zeigt, daß die Kopienzahl von pNTS1-RTanti auch bei längerer Kultivierung in Abwesenheit von G418 unverändert hoch bleibt.

SEQUENZPROTOKOLL

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 383 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
TTCTTAGTCT TCAAGTCTGA GTTACTGGAA AGGAGTTCCA AGAAGACTGG TTATATTTTT 60
CATTTATTAT TGCATTTTAA TTAAAATTTA ATTTACACAA AAGAATTTAG ACTGACAAAT 120
TCAGAGTCTG CCGTTTAAAA GCATAAGGAA AAAGTAGGAG AAAAACGTGA GGCTGTCTGT 180
GGATGGTCGA GGTCGCTTTA GGGAGCCTCG TCACCATTCT GCACTTGCAA ACCGGGCCAC 240
TAGAACCCGG TGAAGGGAGA AACCAAAGCG ACCTGGAAAC AATAGGTCAC ATGAAGGCCA 300
GCCACCTCCA TCTTGTTGTG CGGGAGTTCA GTTAGCAGAC AAGATGGCTG CCATGCACAT 360
GTTGTCTTTC AGGGGTACCA CAC 383
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 434 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```
TTATCATGAA GGCACATTGG ATTTTATGAC AGAGTCTGTG TGTGTGTGTG TGTATAATAT 60
TTCTGCTATG ATTGCAGTTA CTTGCCATCT CGTGGGCTTA TGTTTGATTT CTGTAGTTTT 120
TTAAAATTCT TTAAAATTTT TATTTTATAT TTTTTTAGTT TAGTTTAGTT TAATTTAGTT 180
TAGTTTTCAA GACAGGGTTT CTCTGTATAG CCCTGACTGT CCTGGAAGCTC ACTTTGCAGA 240
CCAGGCTGGC CTCAAACTCA GAAATCCTCC CATCTCTGCC TGAAGAGAGC TGGGATTAAA 300
GACATGCGCC ATCACTCCCG GCTATTTTAA AATTTTAAAA TTATATTTAT TTAATTTATT 360
TTTTTGTTTT TTTCAAGATG TGGTTTCTCT GTGTAAACTC TGGCTGACCT GGAAGTCACT 420
GTGTAGTACC ACAC 434
```

Patentansprüche

- 1) Verfahren zur Hemmung der Replikation von HIV durch Transfektion potentieller Wirtszellen mit einem Vektor, der neben einer für Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat codierenden DNA in antisense-Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.
- 2) Vektor zur Hemmung der Replikation von HIV in potentiellen Wirtszellen, der neben einer für Pol, Gag, Env, Rev und/oder Tat codierenden DNA in antisense-Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.
- 3) Vektor nach Anspruch 2, welcher mehrere DNA Bereiche aus der Gruppe der für Pol, Gag, Env, Rev oder Tat codierenden DNA in antisense Orientierung enthält.
- 4) Vektor nach Anspruch 2 oder 3, welcher eine der in SEQ ID NO 1 oder 2 gezeigten DNA-Sequenzen zur spontanen Amplifikation des Vektors enthält.
- 5) Vektor pNTS1-RTanti (DSM 7303).
- 6) Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 2 - 5 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur therapeutischen Behandlung von HIV-Infektionen.

- 7) Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens einen Vektor, der neben einer für ein Genprodukt, dessen erhöhte Expression eine krankhafte Veränderung bewirkt, codierenden DNA in antisense Orientierung eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.
- 8) Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend mindestens einen Vektor nach einem der Ansprüche 2 - 5.
- 9) Vektor zur in vivo- und ex vivo-Gentherapie, der eine Promotor-Operator-Region zur Expression eines codierenden Gens, dieses codierende Gen und eine weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.
- 10) Vektor nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er eine der in SEQ ID NO. 1 oder 2 gezeigten DNA-Sequenzen zur spontanen Amplifikation des Vektors enthält.
- 11) Verwendung eines Vektors nach den Ansprüchen 9 und 10 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur ex vivo- und/oder in vivo-Gentherapie.
- 12) Vektor zur Hemmung der Proliferation von chronischen Leukämie-Zellen (z. B. CLL CML), der eine Antisensesequenz, welche homolog zu Leukämievirensequenzen ist und weitere DNA enthält, welche eine spontane Amplifikation des Vektors in der Wirtszelle bewirkt.

- 13) Vektor nach Anspruch 12, welcher eine der in SEQ ID NO. 1 oder 2 gezeigten DNA-Sequenzen zur Spontanamplifikation des Vektors enthält.
- 14) Verwendung eines Vektors nach den Ansprüchen 12 und 13 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur therapeutischen Behandlung von chronischen Leukämien.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 93/02968

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/11 C12N15/85 A61K31/70 //A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 19, no. 7, 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 1421 - 1426 RITTNER, K. & SCZAKIEL, G. 'Identification and analysis of antisense RNA target regions of the human immunodeficiency virus type 1' cited in the application see figure 1A; table 1 --- -/--	1-4, 9-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 March 1994

Date of mailing of the international search report

PCT/EP 93/02968

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 93/02968

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 17, no. 23 , 1989 , ARLINGTON, VIRGINIA US pages 9909 - 9932 WEGNER, M. ET AL. 'Cis-acting sequences from mouse rDNA promote plasmid DNA amplification and persistence in mouse cells: implication of HMG-I in their function' cited in the application see the whole document ---	1-4,9-14
Y	WO,A,91 03260 (TEMPLE UNIVERSITY OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 21 March 1991 see the whole document ---	12-14
P,X	GENE (AMST) 129 (2). 1993. 263-268. MEYER J ET AL 'INHIBITION OF HIV-1 REPLICATION BY A HIGH-COPY-NUMBER VECTOR EXPRESSING ANTISENSE RNA FOR REVERSE TRANSCRIPTASE.' see figure 1 -----	5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP 93/02968

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9103260	21-03-91	AU-B- 646643	03-03-94
		AU-A- 6410790	08-04-91
		CA-A- 2065294	02-03-91
		EP-A- 0489846	17-06-92
		JP-T- 5500217	21-01-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 93/02968

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 C12N15/11 C12N15/85 A61K31/70 //A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 5 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH Bd. 19, Nr. 7, 1991, ARLINGTON, VIRGINIA US Seiten 1421 - 1426 RITTNER, K. & SCZAKIEL, G. 'Identification and analysis of antisense RNA target regions of the human immunodeficiency virus type 1' in der Anmeldung erwähnt siehe Abbildung 1A; Tabelle 1 --- -/-</p>	1-4,9-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. März 1994

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

07-04-1994

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Andres, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen
PCT/EP 93/02968

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NUCLEIC ACIDS RESEARCH Bd. 17, Nr. 23 , 1989 , ARLINGTON, VIRGINIA US Seiten 9909 - 9932 WEGNER, M. ET AL. 'Cis-acting sequences from mouse rDNA promote plasmid DNA amplification and persistence in mouse cells: implication of HMG-I in their function' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----</p>	1-4,9-14
Y	<p>WO,A,91 03260 (TEMPLE UNIVERSITY OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION) 21. März 1991 siehe das ganze Dokument ----</p>	12-14
P,X	<p>GENE (AMST) 129 (2). 1993. 263-268. MEYER J ET AL 'INHIBITION OF HIV-1 REPLICATION BY A HIGH-COPY-NUMBER VECTOR EXPRESSING ANTISENSE RNA FOR REVERSE TRANSCRIPTASE.' siehe Abbildung 1 -----</p>	5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internation. Aktenzeichen
PCT/EP 93/02968

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9103260	21-03-91	AU-B- 646643	03-03-94
		AU-A- 6410790	08-04-91
		CA-A- 2065294	02-03-91
		EP-A- 0489846	17-06-92
		JP-T- 5500217	21-01-93
